

DISS. ETH NO. 20426

**Investigation of Acetate and Oxalate Metabolism  
in *Methylobacterium extorquens* AM1**

A dissertation submitted to

**ETH Zurich**

for the degree of

**Doctor of Sciences**

Presented by

**Kathrin Schneider**

Dipl. Biol., University of Freiburg

Born on July, 21<sup>st</sup>, 1978

Citizen of Germany

Accepted on the recommendation of

**Prof. Dr. Julia A. Vorholt**

**Prof. Dr. Jean-Charles Portais**

**Prof. Dr. Hauke Hennecke**

**2012**

## Abstract

*Methylobacterium extorquens* AM1 is a pink-pigmented facultative methylotroph that has been extensively studied for its one-carbon metabolism, but so far little is known about its growth with multi-carbon compounds such as acetate and oxalate. Assimilation of two-carbon compounds requires a strategy that allows producing the precursor metabolites required for biosynthesis, which contain three and more carbon atoms. Growth of organisms harboring the glyoxylate cycle for assimilation of acetyl-CoA has been investigated. However, this thesis gives new insights in acetate metabolism of *M. extorquens* AM1, which lacks isocitrate lyase, the key enzyme in the glyoxylate cycle. MS/MS-based proteomic analysis revealed that the protein repertoire of *M. extorquens* AM1 grown on acetate is similar to that of cells grown on methanol and includes enzymes of the ethylmalonyl-CoA (EMC) pathway that were recently shown to operate during growth on methanol. Dynamic  $^{13}\text{C}$ -labeling experiments indicate the presence of distinct metabolic entry points for acetate, the EMC pathway and the citric acid (TCA) cycle.  $^{13}\text{C}$ -steady state metabolic flux analysis showed that oxidation of acetyl-CoA occurs predominantly via the TCA cycle and that assimilation occurs via the EMC pathway. Furthermore, acetyl-CoA condenses with the EMC pathway product glyoxylate, resulting in malate formation. The latter, also formed by the TCA cycle, is converted to phosphoglycerate by a reaction sequence that is reversed with respect to the serine cycle. The results indicate that the metabolic flux distribution is highly complex in this model methylotroph during growth on acetate and is fundamentally different from organisms using the glyoxylate cycle.

Oxalate is the most oxidized two carbon compound and thus requires a different catabolic and anabolic strategy than acetate. Additionally to proteomics and dynamic  $^{13}\text{C}$ -labeling experiments, mutant characterization was carried out to investigate the central metabolism of *M. extorquens* AM1 during growth on oxalate. The results confirmed that energy conservation from oxalate proceeds as previously described for *M. extorquens* AM1 and other characterized oxalotrophic bacteria via oxalyl-CoA decarboxylase, formyl-CoA transferase and subsequent oxidation to carbon dioxide by formate dehydrogenase. However, in contrast to other oxalate-degrading organisms, the assimilation of this carbon compound in *M. extorquens* AM1 occurs via the operation of a variant of the serine cycle: oxalyl-CoA reduction to glyoxylate, conversion to glycine and its condensation with methylene- $\text{H}_4\text{F}$  (derived from formate) resulting in the formation of C3-units. The EMC pathway operates

## Abstract

during growth on oxalate but is nevertheless dispensable, indicating that oxalyl-CoA reductase is sufficient to provide the glyoxylate required for biosynthesis. Analysis of an oxalyl-CoA synthetase and oxalyl-CoA reductase deficient double mutant revealed an alternative, although less efficient, strategy for oxalate assimilation via one-carbon intermediates. The alternative process consists of formate assimilation via the tetrahydrofolate pathway to fuel the serine cycle, and in this case the EMC pathway is used for glyoxylate regeneration.

The results obtained reveal the utilization of common pathways during the growth of *M. extorquens* AM1 on one-carbon and two-carbon compounds, but with a major redirection of flux within the central metabolism. The plastic central metabolism featuring multiple assimilation routes for C1 and C2 substrates, may contribute to the rapid adaptation of *M. extorquens* AM1 to new substrates and the eventual co-consumption of carbon sources under environmental conditions.

## Kurzbeschreibung

*Methylobacterium extorquens* AM1 ist ein pink-pigmentiertes fakultativ-methylotrophes Bakterium, dessen C1- (organische Substanzen ohne Kohlenstoff-Kohlenstoff Verbindung) Stoffwechsel gut erforscht ist. Über dessen Wachstum auf Substraten mit Kohlenstoff-Kohlenstoff Bindungen, beispielsweise Acetat und Oxalat, ist bisher jedoch wenig bekannt. Für die Assimilation dieser C2-Substrate wird eine Strategie benötigt, welche es erlaubt Vorläufermetabolite herzustellen, welche drei oder mehr Kohlenstoffatome besitzen und für die Biosynthese benötigt werden. Das Wachstum von Organismen, welche für die Acetat-Assimilation den Glyoxylat Zyklus nutzen, wurde bereits untersucht. Diese Arbeit gibt Einblicke in den Acetat-Stoffwechsel von *M. extorquens* AM1, welcher keine Isocitrat-Lyase, das Schlüsselenzym des Glyoxylate Zyklus, besitzt. MS/MS basierende Proteom Analysen zeigten, dass das Protein-Repertoire von *M. extorquens* AM1 während des Wachstums auf Acetat und Methanol sehr ähnlich ist. Auch die Enzyme des Ethylmalonyl-CoA (EMC) Wegs, welche, wie erst kürzlich gezeigt wurde, während der Assimilierung von Methanol in *M. extorquens* AM1 aktiv sind, wurden detektiert. Dynamische <sup>13</sup>C-Markierungsstudien deuteten darauf hin, dass zwei verschiedene Eintrittspforten für Acetat in den zentralen Stoffwechsel existierten, der EMC Weg und der Citrat (TCA) Zyklus. <sup>13</sup>C-Steady-State metabolische Flussanalysen zeigten, dass die Oxidation von Acetyl-CoA überwiegend über den TCA Zyklus stattfindet, und dass die Assimilation über den EMC Weg bewerkstelligt wird. Zusätzlich wird Acetyl-CoA mit Glyoxylat, dem Produkt des EMC Weges, kondensiert um daraus Malat zu bilden. Malat, ist ein Intermediat des TCA Zyklus, und wird nach Oxidation und einem Decarboxylierungsschritt zu Phosphoglycerat umgewandelt. Dies geschieht über die bekannten Reaktionen des Serin Zyklus, welche jedoch in umgekehrter Richtung ablaufen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Flussverteilung im Zentralstoffwechsel in diesem Model-Organismus während des Wachstums auf Acetat sehr komplex ist, und diese unterschiedlich ist im Vergleich zu Organismen, welche den Glyoxylat Zyklus zur Acetyl-CoA Assimilation nutzen.

Oxalat ist die am höchsten oxidierte organische Verbindung und enthält zwei Kohlenstoffatome. Zusätzlich zur Proteome Analyse und dynamischen <sup>13</sup>C-Markierungsstudien wurden Mutanten charakterisiert, um den Zentralstoffwechsel von *M. extorquens* AM1 zu untersuchen. Die Resultate bestätigten, dass wie bereits in vorherigen Studien beschrieben wurde, *M. extorquens* AM1 Oxalat mittels Oxalyl-CoA Decarboxylase

## Kurzbeschreibung

und Formyl-CoA Transferase zu Formiat umwandelt und es anschliessend mittels Formiat Dehydrogenase zu Kohlenstoffdioxid oxidiert. Im Unterschied zu anderen oxalotrophen Organismen, wird diese Kohlenstoffquelle von *M. extorquens* AM1 über eine Variante des Serin Zyklus zu Biomasse umgewandelt: Oxalyl-CoA wird zu Glyoxylat reduziert und schliesslich eine C3 Verbindung daraus gebildet. Hierfür wird Glyoxylat zu Glycin transaminiert und dieses anschliessend mit einer C1-Einheit ausgehend von Formiat kondensiert. Der EMC Weg ist aktiv in Zellen, welche mit Oxalat als Kohlenstoffquelle kultiviert wurden, jedoch ist dieser Stoffwechselweg nicht notwendig für das Wachstum auf Oxalat. Dies deutet darauf hin, dass die Aktivität der Oxalyl-CoA Reduktase ausreichend ist, um für das Wachstum genügend Glyoxylat zu synthetisieren. Das Wachstum einer Oxalyl-CoA Reduktase-negativen Doppelmutante zeigte, dass es noch eine zweite, wenn auch weniger effiziente, Strategie existieren muss, welche es ermöglicht Oxalat in Biomasse umzuwandeln. Diese alternative Stoffwechselroute besteht aus Enzymen des Tetrahydrofolat Weges, über welche Formiat reduziert wird. Das entstandene Methylen-Tetrahydrofolat wird anschliessend über den Serin Zyklus assimiliert. Der EMC Weg ist dann notwendig, um Glyoxylat zu regenerieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass C1 und C2 Kohlenstoffquellen zwar über die gleichen Wege metabolisiert werden, es jedoch zu einer Neuausrichtung der Flüsse innerhalb des Zentralstoffwechsels kommt. Ein "formbarer" Zentralmetabolismus in *M. extorquens* AM1, welcher verschiedene Assimilationsrouten für C1 und C2 Substrate beinhaltet, könnte zu einer schnellen Anpassung des Organismus an neue bzw. ständig wechselnde Kohlenstoffquellen beitragen, oder sogar Co-Konsumation mehrerer Substrate ermöglichen. Dies könnte besonders in natürlichen Lebensräumen des Bakteriums von Vorteil sein.